

PCT

世界知的所有権機関
国際事務局
特許、実用新案、登録商標等の
国際条約に基づいて公開された
出願



(51) 国際特許分類7 G01N 33/92	A1	(11) 国際公開番号 WO00/57191
		(43) 国際公開日 2000年9月28日(28.09.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01663		(74) 代理人 小野信夫(ONO, Nobuo) 〒101-0024 東京都千代田区神田和泉町1-13-1 水戸部ビル4階 Tokyo, (JP)
(22) 国際出願日 2000年3月17日(17.03.00)		(81) 指定国 AU, CA, CN, JP, KR, MX, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE)
(30) 優先権データ 特願平11/80503 1999年3月24日(24.03.99) JP		(75) 添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一化学薬品株式会社 (DAIICHI PURE CHEMICALS CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-0027 東京都中央区日本橋3丁目13番5号 Tokyo, (JP)		
(72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 山本光章(YAMAMOTO, Mitsuaki)[JP/JP] 高橋洋子(TAKAHASHI, Yoko)[JP/JP] 谷口由利子(TANIGUCHI, Yuriko)[JP/JP] 小田原祥子(ODAWARA, Shoko)[JP/JP] 中西一夫(NAKANISHI, Kazuo)[JP/JP] 中村光浩(NAKAMURA, Mitsuhiko)[JP/JP] 日野浩一(HINO, Koichi)[JP/JP] 〒301-0852 茨城県龍ヶ崎市向陽台3丁目3番1号 第一化学薬品株式会社内 Ibaraki, (JP)		

(54)Title: METHOD FOR QUANTITATING CHOLESTEROL

(54)発明の名称 コレステロールの定量法

(57) Abstract

A method for quantitating cholesterol wherein cholesterol contained in a lipoprotein fraction to be measured is quantitated in the presence of a compound having a relatively strong affinity for one of lipoproteins contained in a sample, a surfactant acting relatively strongly on the other lipoprotein and a cholesterol reagent; and a quantification reagent to be used in this method.

試料中的一方のリポ蛋白に対して相対的に強い親和性を有する化合物、他方のリポ蛋白に対して相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール試薬の存在下に測定リポ蛋白分画中に存在するコレステロールを定量する定量法及び該定量法に用いる定量用試薬。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スードン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SK	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SZ	セネガル
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	TD	スウェーデン
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TG	チャード
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TJ	トーゴ
BF	ブルガリア	GH	ガーナ	MC	モナコ	TM	タジキスタン
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドavia	TR	トルコ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TT	トリニダッド・トバゴ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	共和国		UA	ウクライナ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	UG	ウガンダ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	US	米国
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UZ	ウズベキスタン
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	VN	ベトナム
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	YU	ユーゴスラヴィア
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	ZA	南アフリカ共和国
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジエール	ZW	ジンバブエ
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ		
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノールウェー		
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明 紹 書

コレステロールの定量法

5 技 術 分 野

本発明は、少ない試料で簡便な操作により効率良く特定リポ蛋白画分に存在するコレステロールを分別定量することのできるコレステロールの定量法に関する。

10 背 景 技 術

コレステロール等の脂質は、血清中においてアポ蛋白質と結合し、リポ蛋白を形成している。リポ蛋白は物理的な性状の違いにより、カイロミクロン、超低比重リポ蛋白（VLDL）、低比重リポ蛋白（LDL）、高比重リポ蛋白（HDL）等に分類される。これらのリポ蛋白のうち、
15 LDLは動脈硬化を引き起こす原因物質の一つであり、一方HDLは抗動脈硬化作用を示す事が知られている。

疫学的には、LDL中のコレステロール値は、動脈硬化性疾患の発症頻度と正相関を示し、一方、HDL中のコレステロール値は動脈硬化性疾患の発症頻度と逆相関を示す事が知られており、今日では、虚血性心疾患の予防や診断を目的としてHDL中のコレステロールやLDL中のコレステロールの測定が広く行われている。このHDLやLDL中のコレステロールの測定法としては、たとえば超遠心分離によってHDLやLDLを他のリポ蛋白と分離した後、コレステロール測定に供する方法や、電気泳動によって分離した後に脂質の染色を行って、その発色強度を測定する方法が知られている。
20
25

しかしながら、これらの方法は、いずれも、操作が煩雑であったり、

多数の検体を処理できないなどの問題があり、日常的にはほとんど用いられない方法である。

HDL中のコレステロールの測定方法として、臨床検査の領域で一般に広く用いられている方法は、検体に沈澱剤を加えてHDL以外のリポ蛋白を凝集させ、これを遠心分離によって取り除き、分離されたHDLのみを含む上清中のコレステロールを測定する沈澱法である。この方法は、沈澱法や電気泳動法に比較して簡便であるものの、沈澱剤を加えて分離する操作を含むために、比較的多量の検体量を要し、又、分析誤差を生じる可能性も高く、全分析工程を完全に自動化する事はできなかつた。

一方、酵素的にHDL中のコレステロールを分別定量する方法も検討されている。たとえば、胆汁酸塩及び非イオン系界面活性剤の存在下に、酵素反応を行う方法（特開昭63-126498号）が知られている。この方法は、反応初期の酵素反応はLDLコレステロール濃度に比例し、その後HDL中のコレステロール濃度に比例する事を利用したものであるが、HDL中のコレステロールと他のリポ蛋白中のコレステロールの反応を完全に分別する事はできず、正確性に問題があった。

また、HDL以外のリポ蛋白をあらかじめ凝集させておき、HDL中のコレステロールのみを酵素的に反応させた後に、酵素を失活させると同時に凝集を再溶解して吸光度を測定するという方法（特開平6-242110号）が知られている。しかしながら、この方法は少なくとも3回の試薬を添加する操作が必要であるため、限定された自動分析装置にしか適用できず、汎用性の点で問題があった。また、沈澱の再溶解に際しては、高濃度の塩を使う等、分析器機に対するダメージや試薬廃棄の点でも満足できるものではなかった。

更に、特許第2600065号では、通常の沈澱法に用いられる、H

D L 以外のリポ蛋白を沈澱させる沈澱試薬と一般的なコレステロール測定試薬を組み合わせて使用し、沈澱しない H D L 中のコレステロールを測定する方法が開示されており、修飾酵素と硫酸化 α -シクロデキストリンの組み合わせで実施できるものとされている。

5 更にまた、沈澱剤の影響を軽減するために界面活性剤を共存させるもの（特開平 8-116996 号）や H D L 以外を沈澱させるものとして従来沈澱法に用いられていた試薬以外でも、抗体を使用するもの（特開平 9-96637 号）、カラギナンを使用するもの（特開平 9-121895 号）、糖化合物を使用するもの（特開平 7-301636 号）などがあるが、正常な血清を混合した際でも凝集による濁りの生成があったり、測定対象でない H D L 以外のリポ蛋白（L D L、V L D L 等）を凝集させることを条件としているなどの問題があった。また、L D L 中のコレステロール測定法として、臨床検査の領域で一般に広く用いられる方法としては、フリードワルドら（クリニカル ケミストリー、1972 年 18 巻、459-502 頁）の方法が知られている。この方法は、酵素的測定法により求めた総コレステロール、H D L コレステロール、中性脂肪の値を用いて、L D L コレステロールを算出する方法であるが、中性脂肪 400 mg/dl を超える場合には適用できないなどの問題がある。

20 したがって、本発明の目的は、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率よく測定する事ができ、種々の自動分析装置に適用できる特定画分中のコレステロールの定量法を提供することにある。

発明の開示

25 かかる実状において、本発明者等は鋭意研究を行った結果、試料中的一方のリポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物と、試料中の

他方のリポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤の存在下でコレステロール測定用酵素試薬との反応を行えば、試料中の特定のリポ蛋白中に存在するコレステロールとその他のリポ蛋白に含まれるコレステロールの反応に顕著な差を設けることができ、実質的に十分な感度で目的とするリポ蛋白中のコレステロールを分別測定できることを見出した。

すなわち本発明は、試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の測定リポ蛋白画分中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法である。

また本発明は、試料中の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の非測定リポ蛋白中に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する測定リポ蛋白中のコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法である。

更に本発明は、試料中の第1の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第1のリポ蛋白に比べ試料中の第2の測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の第2の測定リポ蛋白に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する第1の測定リポ蛋白中のコレステロールを測定し、更にこれと総コレステロール濃度から、各リポ蛋白のコレステロール濃度を求める方法である。

更にまた本発明は、上記各方法を実施するための試料中的一方のリポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、他方のリポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別

個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬を提供するものである。

図面の簡単な説明

5 図 1 は、実施例 4 の方法と従来の沈殿法との相関関係を示す図面である。

図 2 は、実施例 5 の方法と従来の沈殿法との相関関係を示す図面である。

10 図 3 は、実施例 6 の方法と従来の沈殿法との相関関係を示す図面である。

図 4 は、実施例 7 の方法と従来の沈殿法との相関関係を示す図面である。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明においては、リポ蛋白中に含まれるコレステロールをコレステロール測定用試薬と反応させるに先立ち、試料中の一方のリポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物（以下、「選択親和剤」という）および他方のリポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤（以下、「選択作用活性剤」という）を添加することが必要である。

20 このうち、選択親和剤は、反応ないしは測定を希望しないリポ蛋白と相互作用を有し、当該リポ蛋白のコレステロール測定用試薬との反応を妨害ないしは抑制する働きをするものである。また、選択作用活性剤は、反応ないしは測定すべきリポ蛋白と反応ないしは測定を希望しないリポ蛋白が同一系中に存在する場合に、反応ないしは測定すべきリポ蛋白に対して強く作用し、これとコレステロール測定用試薬との反応を促進する作用を有するものである。

本発明で使用する選択親和剤および選択作用活性剤には、それぞれ一方のリポ蛋白に対する相対的な親和性および他方のリポ蛋白に対する相対的に強い作用を有するものであり、絶対的なものまでは要求されない。その理由は、一方のみの選択使用では問題となる相対的な誤差も、両者
5 の使用により問題とならないレベルまで低減され、実用上は問題とならないからである。

本発明において使用される選択親和剤は、反応ないしは測定を希望しないリポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分に対し親和性を有する化合物が挙げられる。ここでいうリポ蛋白表層を構成する成分としては、コレステロール、リン脂質、アポ蛋白質等が挙げられる。
10

この選択親和剤としては、サポニン類、ポリエン系物質、コレステロール誘導体、ペプチド類、レクチン類、リン脂質誘導体等を挙げることができる。このうちコレステロールに親和性を有するサポニン類としては、例えばジギトニン、トマチンなどが、ポリエン系物質としては、ナ
15 イスタチン、フィリピン、ピマシリン、ペントマイシン、トリコマイシン、フンジクロミン、ペリマイシン、アンホテリシン、エトルスコマイシン、プリマイシン、カンジジンなどが、コレステロール誘導体としては、[N-[2-(コレステリルカルボキシアミノ)エチル]カルバモイルメチル] プルラン(略称: Chol-AECM-プルラン)などが、
20 ペプチド類としてはバシトラシン、ポリミキシン、スズカシリン、グラミシジンなどが、レクチン類としてはコンカナバリンA、ヒマレクチン、ピーナツレクチンなどが、リン脂質誘導体としては、L- α -ホスファチジルグリセロールジパルミトイルなどがそれぞれ挙げられる。

前記例示した選択親和剤のうち、一部のものは試薬組成などの条件によ
25 っては、リポ蛋白を含む試料と混合させた際に若干の濁りが観察されることがあるので、リポ蛋白の凝集が生じている場合もあると推定され

る。しかしながら、本発明にとって、非測定リポ蛋白が凝集していることは必須ではない。

例えば、サポニン誘導体であるジギトニン、コレステロール誘導体であるChol-AECM-プルラン、ポリエン系物質であるフィリピン、5 リン脂質誘導体であるL- α -ホスファチジルグリセロールジパルミトイルなどは、それぞれ本発明の効果が得られる条件でリポ蛋白を含む試料と混合しても濁りは観察されない。

本発明の選択親和剤にとって重要なことは、リポ蛋白中のコレステロールと酵素の反応を妨害ないしは抑制するような形で、リポ蛋白表層を10 構成する成分と吸着あるいは結合等をすることであり、リポ蛋白どうしが凝集して塊を形成する必要は全くない。

これらの選択親和剤は、単独で、あるいは2種以上を組み合わせて用いる事ができ、またその使用量は、化合物によって異なり、特に制限されるものではないが、1nM～0.1Mまたは $1 \times 10^{-7}\%$ ～10%の範15 囲程度であり、好ましくは10nM～0.1Mまたは $1 \times 10^{-6}\%$ ～1%で使用される。またこれら化合物を溶解する目的で、アルコールなどの有機溶媒類、界面活性剤類、リン脂質類を用いてもよい。これらの溶解剤類は単独で、あるいは2種以上を組み合わせて用いる事ができ、またその使用量は化合物によって異なり、特に制限されるものではない。

一方、選択作用活性剤としては、反応ないしは測定すべきリポ蛋白と反応ないしは測定を希望しないリポ蛋白に対する作用強度が相違するものであればイオン性、非イオン性のいずれでも良く、例えば、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレン高級アルコールエーテル、ポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテル等が挙げられる。特に好ましい選択作用活性剤としては、それ単独で特定の25

リポ蛋白に対し特に強い反応性を有する界面活性剤として公知のポリオキシエチレンアルキレンフェニルエーテル、ポリオキシエチレンアルキレントリベンジルフェニルエーテルが挙げられる（特開平9-313200号）。これらの選択作用活性剤の市販品の例としてはTriton 5 X-100、エマルゲン709、エマルゲンA-60、エマルゲンB-66、ヘプタンスルホン酸、オクタンスルホン酸などを挙げができる。

本発明の選択作用活性剤は、単独で、或いは2種以上を組み合わせて用いる事ができる。またその使用量は化合物によって異なり、特に制限10されるものではないが、0.0001%～5%で、好ましくは0.001%～5%で使用される。

本発明を実施するにあたり、選択親和剤と選択作用活性剤とを、検体である血清へ添加するに際しては、それぞれを別途添加しても、またこれらを混合物として同時に添加してもよい。更にコレステロールの測定15方法としては、公知の酵素的測定法のいずれも用いる事ができるが、例えば酵素試薬としてコレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを組み合わせて用いる方法、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールデヒドロゲナーゼを組み合わせて用いる方法等が挙げられる。これらのうち、コレステロールエステラーゼ及びコレステロールオキシダーゼを組み合わせて用いる方法が好ましい。

更にまた、これらのコレステロール測定用酵素試薬を添加した後、最終的にコレステロールを検出する方法は特に制限されず、例えばパーオキシダーゼと色原体をさらに組み合わせて行う吸光度分析、補酵素や過酸化水素を直接検出する方法等が挙げられる。

25 本発明方法の具体的な態様は、次の方法で示される。

（1）試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化

合物、測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の測定リポ蛋白中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法。

5 (2) 試料中の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の非測定リポ蛋白中に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する測定リポ蛋白中のコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法。

10 (3) 試料中の第1の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第1のリポ蛋白に比べ試料中の第2の測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の第2の測定リポ蛋白中に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する第1の測定リポ蛋白中のコレステロールを測定し、更にこれと総コレステロール濃度から、各リポ蛋白中のコレステロール濃度を求める方法。

15 また、上記方法の実施に当たっては、選択親和剤、選択作用活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬を使用することが便利である。このコレステロール定量試薬は、上記各方法に対応して、次の如く構成される。

20 方法(1)を実施するための試薬：

試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロール定量用試薬。

方法（2）を実施するための試薬：

試料中の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬。

方法（3）を実施するための試薬：

試料中の第1の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第1のリポ蛋白に比べ試料中の第2の測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬

上記のコレステロールの定量用試薬中には、一般的に汎用される緩衝液、例えば、りん酸、グッドの緩衝液などを含有させることができる。この定量用試薬を溶解させた場合のpHの範囲も酵素試薬に影響しない範囲であれば特に限定されるものではない。また塩化ナトリウムなどの無機の塩、酵素活性安定化のため使用されるアルブミンなどの添加剤、2価金属の塩や防腐効果のある化合物なども使用することができる。

以上説明した本発明方法によれば、遠心分離などの前処理の必要がなく、簡便な操作で効率良く特定画分中のコレステロールを定量する事ができる。また、少ない試料で、簡便な操作により、特異的な測定が可能であるため、種々の自動分析装置に適用でき、臨床検査の領域に置いても極めて有用である。

実施例

次に、実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明はこれらに何ら制約されるものではない。

実施例 1

リポ蛋白を含む検体について、下記方法で検体を調製後、同じく下に示す方法でリポ蛋白画分毎のコレステロール量を測定し、反応性を比較した。この結果を表1に示す。

5 (検体の調製)

ヒト血清から超遠心分離法により、VLDL、LDL、HDLの各画分に分離し試料とした。

(測定法)

検体3μlに、0.005%ジギトニンを含む50mMのりん酸緩衝液(pH 6.5) (第1試薬) 300μlを添加した。次いで約5分後に、トリトンX-100 0.2%、コレステロールエステラーゼ1U/mI、コレステロールオキシダーゼ1U/mI、パーオキシダーゼ5U/mI及びジスルホブチルメタトルイジン0.04%、4-アミノアンチピリン0.004%を含む50mMのりん酸緩衝液(pH 6.5)からなるコレステロール測定試薬(第2試薬) 100μlを加えた。

コレステロール測定試薬添加直前と添加後5分後の600nmと700nmにおける吸光度を測定し、その差よりリポ蛋白画分間の反応性を比較した(2ポイント法)。なお、以上の操作は、日立7150型自動分析装置を用いて行った。

20 (結果)

表 1

試 料	選択親和剤 の添加なし	0.005% ジギトニン添加
HDL画分	0.104 (100%)	0.099 (95%)
LDL画分	0.315 (100%)	0.218 (69%)
VLDL画分	0.267 (100%)	0.136 (51%)

(数値は吸光度)

10

表 1 の結果より、ジギトニンを系内に存在させることにより LDL 中のコレステロールや VLDL 中のコレステロールに比べ HDL 中のコレ

15 テロールが優先的に酵素反応することが分かる。

実 施 例 2

実施例 1 の第 1 試薬のジギトニンを 0.005% Chol-AECM - プルラン、第 2 試薬の界面活性剤トリトン X-100 を 1% エマルゲン B-66 に代える以外は実施例 1 に従って測定し、測定値を比較した。この結果を表 2 に示す。

(結 果)

25

表 2

試 料	選択親和剤 の添加なし	0.005% Chol- AECM-ブルラン添加
HDL画分	0.133 (100%)	0.132 (99%)
LDL画分	0.028 (100%)	0.019 (67%)
VLDL画分	0.025 (100%)	0.013 (50%)

(数値は吸光度)

10

表2の結果より Chol-AECM-ブルランを系内に存在させることにより、LDL中のコレステロールやVLDL中のコレステロールに比べHDL中のコレステロールが優先的に酵素反応することが分かる。

15

実施例 3

実施例1と同様に調製した検体を使用し、下記組成の試薬により、実施例1と同様の方法でリポ蛋白画分毎のコレステロール量を測定し、反応性を比較した。この結果を表3に示す。

20 (使用 試 薬)

第1試薬：

5 mM L- α -ホスファチジルグリセロールジパルミトイル、

0.5% Triton X-100を含む50 mMのPIPES緩衝液

25 (pH 6.5)。

コレステロール測定試薬：

コレステロールエステラーゼ 1 U / ml 、コレステロールオキシダーゼ 1 U / ml 、パーオキシダーゼ 5 U / ml 、ジスルホブチルメタトルイジン 0.04 % 及び 4-アミノアンチピリン 0.004 % を含む 50 mM の P I P E S 緩衝液 (pH 6.5)。

5 (結 果)

表 3

試 料	選択親和剤 の添加なし	5 mM L- α - Phosphatidyl Glycerol Dipalmitoyl
10		
HDL 画分	111.8 (100%)	107.2 (96%)
LDL 画分	328.6 (100%)	200.4 (61%)
15 VLDL 画分	161.9 (100%)	59.6 (37%)

(数値は吸光度)

表 3 の結果より、 L- α -ホスファチジルグリセロールジパルミトイルを系内に存在させることにより LDL 中のコレステロールや VLDL 中のコレステロールに比べ、 HDL 中のコレステロールが優先的に酵素反応することが分かる。

実 施 例 4

リボ蛋白を含む 25 例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈澱法により、 HDL 中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。

すなわち、検体 $3 \mu\text{l}$ に、ジギトニン 0.005% (40 μM) を含む 50 mM の MES 緩衝液 (pH 6.5) (第1試薬) $300 \mu\text{l}$ を添加した。次いで約 5 分後に、エマルゲン B-66 1%、コレステロールエステラーゼ 1 U/m l 、コレステロールオキシダーゼ 1 U/m l 、
5 パーオキシダーゼ 5 U/m l 及びジスルホブチルメタトルイジン 0.04%、4-アミノアンチピリン 0.004% を含む 50 mM のりん酸緩衝液 (pH 6.5) からなるコレステロール測定試薬 (第2試薬) $100 \mu\text{l}$ を加えた。

コレステロール測定試薬添加直前と添加 5 分後での、600 nm と 7
10 00 nm における吸光度を測定し、その差より血清検体中の HDL コレ
ステロール濃度を求めた (2 ポイント法)。また、較正用物質として濃度既知のコントロール血清を用いた。なお、以上の操作は、日立 715
0 型自動分析装置を用いて行った。

一方、沈殿法 (比較法) での HDL 中のコレステロールの測定は、次
15 のようにして行った。すなわち、リンタングステン酸ナトリウム 0.3
% 及び塩化マグネシウム 2% を含む水溶液 $200 \mu\text{l}$ を検体 $200 \mu\text{l}$ と混和し、3000 rpm で 10 分間遠心分離を行った。この上清 5
10 μl を採取し、Triton X-100 1%、コレステロールエステラーゼ 1 U/m l 、パー²⁰
オキシダーゼ 5 U/m l 及びジスルホブチルメタトルイジン 0.04%、4-アミノアンチピリン 0.004% を含む 100 mM の MES 緩
衝液 (pH 6.5) からなるコレステロール測定試薬 $3 \text{m}\text{l}$ と混合し、
37°C で 10 分間インキュベートした後、600 nm における吸光度を
測定し、HDL 中のコレステロール濃度を求めた。これらの結果を表 4
25 および図 1 に示す。

(結 果)

表 4

Sample No.	分画法 (mg/dl)	測定値 (mg/dl)
1	99.6	103.6
2	91.8	95.2
3	81.6	86.6
4	78.6	80.1
5	71.9	74.4
6	70.3	71.9
7	67.6	72.4
8	70.1	72.1
9	66.6	70.1
10	64.5	67.4
11	64.5	67.4
12	60.9	63.2
13	60.3	62.6
14	54.6	55.0
15	55.0	56.9
16	50.7	51.0
17	50.9	52.7
18	49.2	51.2
19	47.0	48.7
20	45.7	47.4
21	41.0	41.8
22	37.9	40.2
23	39.6	40.3
24	94.8	98.4
25	88.5	93.3
相関係数		0.999
傾き		1.052
切片		-0.921

5

10

15

20

25 実施例 5

表 4 および図 1 に示したとおり、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈澱法と極めて良好な相関を有するものであることが示された。

実施例 4 において、第 1 試薬に加えたジギトニンを、0.1% ポリミ

キシンBおよび0.005%コンカナバリンAに代える以外は実施例4と同一にし、リポ蛋白を含む25例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈殿法により、HDL中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。この結果を表5および図2に示す。

5 (結 果)

表5

Sample No.	分画法 (mg/dl)	測定値 (mg/dl)
1	113.8	112.4
2	100.3	104.0
3	96.9	98.9
4	91.6	97.3
5	86.5	89.1
6	83.9	87.2
7	83.7	87.4
8	79.0	82.0
9	78.2	79.6
10	74.7	78.3
11	72.5	74.0
12	72.3	71.9
13	70.4	73.2
14	66.5	68.4
15	65.9	68.7
16	62.7	64.8
17	58.0	59.7
18	52.5	54.4
19	49.7	52.1
20	45.6	47.8
21	42.3	45.9
22	39.0	40.7
23	39.8	40.8
24	38.2	38.4
25	34.2	36.7
相関係数		0.998
傾き		1.007
切片		1.775

10

15

20

25

表5および図2の結果より、本発明方法は簡便な操作であるにもかか

わらず、従来の沈澱法と良好な相関を有するものであることが示された。

実施例 6

実施例 4において、第 1 試薬にて加えたジギトニンを 0.005% (7.6 μ M) フィリピンに代える以外は実施例 4 と同一にし、リポ蛋白を含む 25 例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈澱法により、HDL 中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比較した。この結果を表 6 および図 3 に示す。

(結 果)

10

15

20

25

表 6

Sample No.	分画法 (mg/dl)	測定値 (mg/dl)
1	113.8	120.7
2	100.3	111.7
3	96.9	105.6
4	91.6	102.0
5	86.5	90.2
6	83.9	93.0
7	83.7	90.5
8	79.0	80.0
9	78.2	80.7
10	74.7	80.9
11	72.5	80.1
12	72.3	72.9
13	70.4	73.1
14	66.5	67.9
15	65.9	67.0
16	62.7	65.3
17	58.0	59.4
18	52.5	58.0
19	49.7	55.8
20	45.6	48.0
21	42.3	45.6
22	39.0	41.2
23	39.8	41.7
24	38.2	40.7
25	34.2	41.1
相関係数		0.993
傾き		1.075
切片		-0.473

2 0

表 6 および図 3 の結果より、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈澱法と良好な相関を有するものであることが示された。

実 施 例 7

2 5 リポ蛋白を含む 30 例の血清検体について、本発明方法及び従来の沈澱法により、HDL 中のコレステロールを定量し、これらの測定値を比

較した。

すなわち、検体 $2 \mu\text{l}$ に、ジギトニン 0.0075% (60 μM)、
エマルゲン B-66 0.25%、コレステロールエステラーゼ 0.25
U/ ml 、コレステロールオキシダーゼ 0.25 U/ ml 、パーオキシ
ダーゼ 1.25 U/ ml 、ジスルホブチルスタトルイジン 0.01%、
及び 4-アミノアンチピリン 0.005% を含む 50 mM の P I P E S
緩衝液 (pH 6.5) からなる選択親和剤を含むコレステロール測定試
薬 $260 \mu\text{l}$ を加えた。

検体に選択親和剤を含むコレステロール測定試薬添加後、約 2 分及び
約 7 分の時点で、600 nm と 700 nm における吸光度を測定し、そ
の差より血清検体中の HDL コレステロールを求めた (2 ポイント法)。
また、較正用物質として濃度既知のコントロール血清を用いた。なお、
以上の操作は、日立 7170 型自動分析装置を用いて行った。

なお、沈澱法 (比較法) での HDL 中のコレステロールの測定は、実
施例 3 と同様に行った。これらの結果を表 7 及び図 4 に示す。

(結 果)

表 7

Sample No.	分画法 (mg/dl)	測定値 (mg/dl)
5	103.2	103.7
	91.8	91.6
	89.4	91.6
	83.4	88.6
	82.7	84.2
10	80.6	82.3
	78.9	79.7
	77.0	77.6
	76.2	79.1
	74.9	76.4
	76.1	72.9
	77.6	79.4
	67.5	68.6
	65.7	69.0
	69.0	71.9
15	66.5	65.4
	62.3	64.0
	61.3	63.2
	57.3	56.8
	53.9	55.4
20	54.9	54.5
	52.1	52.4
	47.4	47.1
	46.4	44.6
	41.7	42.3
	39.1	42.1
	38.6	38.6
	32.3	33.5
	31.8	33.2
	26.5	32.4
相関係数		0.995
傾き		0.995
切片		1.485

25 表 7 及び図 4 に示したとおり、本発明方法は簡便な操作であるにもかかわらず、従来の沈澱法と極めて良好な相関を有するものであることが

- 22 -

示された。

5

10

15

20

25

請求の範囲

1. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の測定リポ蛋白画分中に存在するコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法。
5
2. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、当該リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分に親和性を有するものである請求項第1項記載のコレステロール定量法。
10
3. 非測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がコレステロールである請求項第2項記載のコレステロールの定量法。
15
4. 非測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がリン脂質である請求項第2項記載のコレステロールの定量法。
5. 非測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がアポ蛋白質である請求項第2項記載のコレステロールの定量法。
20
6. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、サポニン、ポリエン系物質、コレステロール誘導体、ペプチド類、レクチン類、リン脂質誘導体からなる群より選ばれる化合物の1種以上である請求項1記載のコレステロールの定量法。
25

7. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物がサポニンである請求項第1項または第6項記載のコレステロールの定量法。

5 8. サポニンがステロイド系サポニンである請求項第7項記載のコレステロールの定量法。

9. サポニンがジギトニンまたはトマチンである請求項第7項または第8項記載のコレステロールの定量法。

10 10. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、ポリエン系物質である請求項第1項または第6項記載のコレステロールの定量法。

15 11. ポリエン系物質がポリエン系抗生物質である請求項第10項記載のコレステロールの定量法。

20 12. ポリエン系物質が、ナイスタチン、フィリピン、ピマシリン、ペンタマイシン、トリコマイシン、フンジクロミン、ペリマイシン、アンホテリシン、エトルスコマイシン、プリマイシンおよびカンジジンよりなる群から選ばれたものである請求項第10項または第11項記載のコレステロールの定量法。

25 13. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物がペプチド類である請求項第1項または第6項記載のコレステロールの定量法。

14. ペプチド類がバシトラシン、ポリミキシン、スズカシリンまたはグラミシジンである請求項第13項記載のコレステロールの定量法。

5 15. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物がレクチン類である請求項第1項または第6項記載のコレステロールの定量法。

10 16. レクチン類がコンカナバリンA、ヒマレクチンまたはピーナッツレクチンである請求項第15項記載のコレステロールの定量法。

17. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、ステロイド結合性化合物である請求項第1項記載のコレステロールの定量法。

15 18. 試料中の非測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロール定量用試薬。

20 19. 試料中の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の非測定リポ蛋白中に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する測定リポ蛋白中のコレステロールを測定することを特徴とする選択的コレステロールの定量法。

20. 試料中の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、当該リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分に親和性を有するものである請求項第19項記載のコレステロール定量法。

5 21. 測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がコレステロールである請求項第20項記載のコレステロールの定量法。

22. 測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がリン脂質である請求項第20項記載のコレステロールの定量法。

10

23. 測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がアポ蛋白質である請求項第20項記載のコレステロールの定量法。

15 24. 試料中の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、非測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬。

20 25. 試料中の第1の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第1のリポ蛋白に比べ試料中の第2の測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬の存在下、試料中の第2の測定リポ蛋白中に存在するコレステロールを優先的に反応させた後、残存する第1の測定リポ蛋白中のコレステロールを測定し、更にこれと総コレステロール濃度から、各リポ蛋白中のコレステロール濃度を求める方法。

25

26. 試料中の第1の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物が、当該リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分に親和性を有するものである請求項第25項記載のコレステロール測定法。

5 27. 第1の測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がコレステロールである請求項第26項記載のコレステロールの定量法。

28. 第1の測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がリン脂質である請求項第26項記載のコレステロールの定量法。

10

29. 第1の測定リポ蛋白のリポ蛋白表層を構成する成分がアポ蛋白質である請求項第26項記載のコレステロールの定量法。

30. 試料中の第1の測定リポ蛋白に対し相対的に強い親和性を有する化合物、第1のリポ蛋白に比べ試料中の第2の測定リポ蛋白に対し相対的に強く作用する界面活性剤およびコレステロール測定用試薬を別個にまたは組み合わせて構成されるコレステロールの定量用試薬。

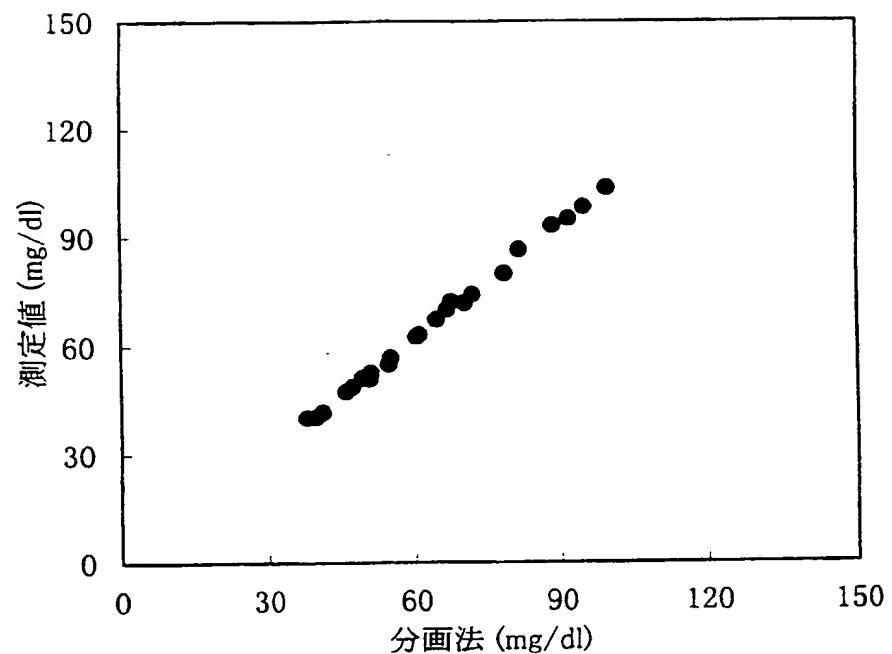
15 20

25

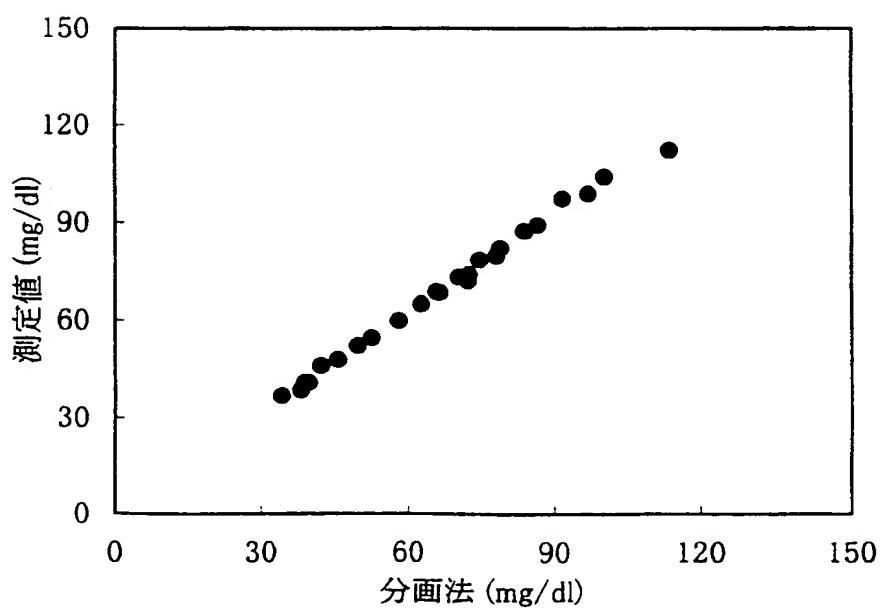
THIS PAGE BLANK (USPTO)

1 / 2

第 1 図



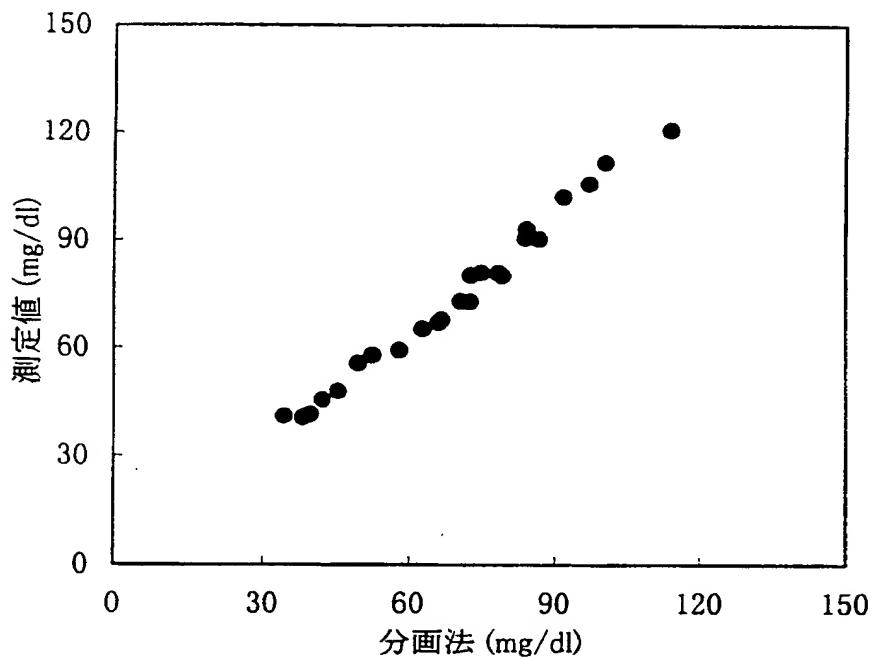
第 2 図



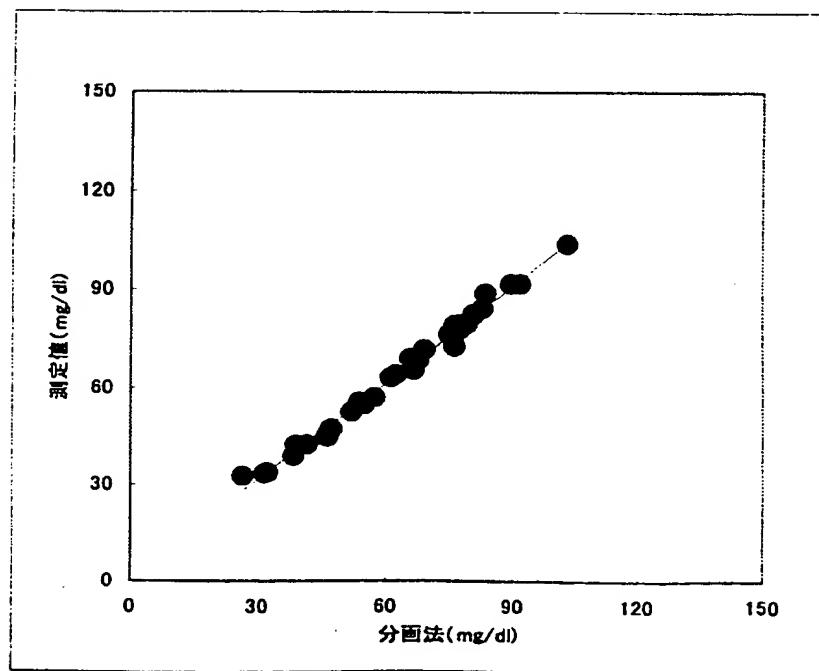
THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 2

第3図



第4図



THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01663

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ G01N33/92

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ G01N33/92

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2000
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2000 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2000

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 98/26090, A1 (Denka Seiken Co., Ltd.), 18 June, 1998 (18.06.98) & EP, 887422, A	1~30
A	JP, 7-301636, A (Kyowa Medetsukusu K.K.), 14 November, 1995 (14.11.95) & EP, 698791, A	1~30
A	JP, 9-96637, A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 08 April, 1997 (08.04.97) (Family: none)	1~30
AA	JP, 9-121895, A (Iatron Lab. Inc.), 13 May, 1997 (13.05.97) (Family: none)	1~30
A	JP, 10-311833, A (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 24 November, 1998 (24.11.98) & EP, 878716, A	1~30
A	JP, 11-9300, A (Iatron Lab. Inc.), 19 January, 1999 (19.01.99) (Family: none)	1~30

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
05 June, 2000 (05.06.00)

Date of mailing of the international search report
13 June, 2000 (13.06.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' G01N33/92

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' G01N33/92

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2000年
日本国登録実用新案公報	1994-2000年
日本国実用新案登録公報	1996-2000年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 98/26090, A1 (デンカ生研株式会社) 18. 6月. 1998 (18. 06. 98) & EP, 887422, A	1~30
A	JP, 7-301636, A (協和メデックス株式会社) 14. 11月. 1995 (14. 11. 95) & EP, 698791, A	1~30
A	JP, 9-96637, A (和光純薬工業株式会社) 8. 4月. 1997 (08. 04. 97) (ファミリーなし)	1~30

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 05. 06. 00	国際調査報告の発送日 13.06.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 龟田 宏之 印 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
A	JP, 9-121895, A (株式会社ヤトロン) 13. 5月. 1997 (13. 05. 97) (ファミリーなし)	1~30
A	JP, 10-311833, A (和光純薬工業株式会社) 24. 11月. 1998 (24. 11. 98) &EP, 878716, A	1~30
A	JP, 11-9300, A (株式会社ヤトロン) 19. 1月. 1999 (19. 01. 99) (ファミリーなし)	1~30